

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年3月7日 (07.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/17957 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/22, 9/08, 47/18, 47/26, 47/02

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206号 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07600

(22) 国際出願日: 2001年9月3日 (03.09.2001)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-266095 2000年9月1日 (01.09.2000) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 泰 (SATO, Yasushi) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SOLUTION PREPARATIONS STABILIZED OVER LONG TIME

(54) 発明の名称: 長期安定化溶液製剤

(57) Abstract: G-CSF solution preparations which are substantially free from any protein as a stabilizer and contain at least one amino acid or its salt as a stabilizer.

(57) 要約:

安定化剤として、実質的にタンパク質を含まず、また安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を含むG-CSF溶液製剤。

明細書
長期安定化溶液製剤

技術分野

- 5 本発明はG-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）溶液製剤に関し、特に長期保存した後も活性成分の損失が少なく、かつG-CSFのメチオニン残基酸化体生成率の低い、安定化させたG-CSF製剤に関する。

背景技術

- 10 G-CSFは、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約2万の糖タンパク質である。

- 本出願人によって、口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株を培養することにより高純度のヒトG-CSFが精製されて以来、これを契機に、ヒトG-CSF遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的方法によって微生物
15 や動物細胞で組換えヒトG-CSFを大量に生産することが可能になった。また、本願出願人はこの精製したG-CSFの製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第2116515号）。

- G-CSFは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1～1000
μg（好ましくは5～500μg）のG-CSFを含有する製剤を1～7回/週
20 の割合で投与する。しかしながら、このG-CSFは例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G-CSFは不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的変化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。

- 従来、これらの影響を防ぐために、剤形として主に凍結乾燥製剤が選択され、
25 種々の処方設計がなされてきた。例えば、（a）トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから選ばれる少なくとも1種のアミノ酸；（b）少なくとも1種の含硫還元剤；又は（c）少なくとも1種の酸化防止剤；からなる群から選ばれる少なくとも1種を含む製剤（特許第2577744号）等が提案されている。また、

安定化剤としてポリソルベートなどの界面活性剤を含むG-C S F 製剤がある(特開昭63-146826号)。

また、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含有したG-C S F 凍結乾燥製剤も報告されている(特表平8-504784号)。

- 5 しかし、凍結乾燥の工程は、工業的には生産コストの増大を招き、さらに機械トラブルによる危険性の増大を伴うことになる。さらに、凍結乾燥製剤は使用時に純水(注射用滅菌水)に溶解して使用しなければならないという手間がかかる、という問題があった。

- 10 一方、従来市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的变化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウィルスのコンタミを除去する等のために非常に煩雑な工程を必要とする等の問題があった。

- 15 しかしながら、このようなタンパク質を添加しない場合には、G-C S F のメチオニン残基の酸化体の生成が多くなり、品質劣化をもたらすという問題があった。

以上の理由から、安定化剤としてタンパク質を含有せず、しかも長期の保存にも安定な、凍結乾燥製剤に代わるG-C S F の溶液製剤が求められている。

20 発明の開示

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤として特定アミノ酸を組み合わせて添加することによって、長期保存後でもG-C S F 残存率が高く、かつG-C S F のメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C S F 溶液製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

- 25 すなわち、本発明は、安定化剤として、実質的にタンパク質を含まず、また安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を含むG-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、アミノ酸がグリシン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上である、前記G-C S F

溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、アミノ酸がアルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上である、前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、アミノ酸がヒスチジン又はその塩である、前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、メチオニンをさらに含む、前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、アミノ酸の添加量が0.01重量%～10重量%である前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 10 本発明はさらに、ヒスチジン又はその塩の添加量が0.01重量%～10重量%である前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、マンニトール及び／又は塩化ナトリウムをさらに含む前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤をさらに含む前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 15 本発明はさらに、界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、pHが5～7である前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 20 本発明はさらに、pHが5.5～6.8である前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

本発明はさらに、G-C S F がCHO細胞から産生されたG-C S F である、前記G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 25 本発明はさらに、バイアル製剤又はプレフィルドシリンジ製剤である前記G-C S F 製剤を提供する。

本発明はさらに、40℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上であり、あるいは25℃-6ヶ月間の安定性試験後におけるG-C S F 残存率が97%以上であり、あるいは10℃-1年間の安定性試験後におけるG-C S F 残存率が97%以上であり、かつ40℃-2週間の加速試験後G-C S

F のメチオニン残基酸化体生成率が 1 % 以下である、安定な G-C S F 溶液製剤を提供する。

- 本発明はさらに、実質的に G-C S F のメチオニン残基酸化体を含まない、安定な G-C S F 溶液製剤を提供する。ここで、「実質的に G-C S F のメチオニン残基酸化体を含まない」とは、前記 G-C S F のメチオニン残基酸化体が検出限界以下のものをいう。

本発明はさらに、安定化剤として、実質的にタンパク質を添加せず、また安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を添加することを含む G-C S F 溶液製剤の安定化方法を提供する。

- 10 本発明はさらに、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩の、安定化された G-C S F 溶液製剤の製造のための使用を提供する。

本発明の溶液製剤とは、製造工程で凍結乾燥の工程を含まず、溶液状態で長期保存可能な製剤をいう。

15 発明を実施するための最良の態様

- 本発明の溶液製剤に使用する G-C S F は高純度に精製されたヒト G-C S F であれば全て使用できる。具体的には、哺乳動物、特にヒトの G-C S F と実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られる G-C S F
- 20 には天然の G-C S F とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の 1 または複数に欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明における G-C S F は、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C 1 2 7 細胞、COS 細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。
- 25 好ましくは大腸菌、イースト菌又は CHO 細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくは CHO 細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。さらには、PEG 等により化学修飾された G-C S

Fも含む（国際特許出願公開番号WO 90/12874参照）。

本発明のG-C-S-F溶液製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

- 5 本発明のG-C-S-F溶液製剤は、安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を含む。上記アミノ酸としては、グリシン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上であることが好ましく、アルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上であることがより好ましく、ヒスチジン又はその塩であることが最も好ましい。

- 10 本発明で用いるアミノ酸は、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の製剤には、これらのアミノ酸のD-、L-およびDL-体を含み、より好ましいのはL-体ならびにその塩である。

- 15 本発明の製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には0.001~10重量%、好ましくは0.01~5重量%で、より好ましくは0.1~3重量%である。ヒスチジン又はその塩の場合には、通常0.01~10重量%、好ましくは0.05~3重量%で、より好ましくは0.1~2重量%である。ヒスチジン塩酸塩の場合には、40℃-2週間加速試験では、試験した0.1~1.6重量%の範囲で極めて高いG-C-S-F残存率を示し、0.4重量%で最も高い残存率を示した。

- 20 本発明のG-C-S-F溶液製剤には、メチオニンを含むことが好ましい。メチオニンの添加量は好ましくは0.001~5重量%、さらに好ましくは0.01~1重量%、最も好ましいのは0.1重量%である。メチオニンの添加により、G-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率を検出限界以下にすることが観察された。本発明者らは、特定の理論に拘束されるつもりはないが、G-C-S-Fのメチオニン残基に代えて、添加されたメチオニンが酸化されることにより、G-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率を低くすると推測した。
- 25

本発明の製剤には等張化剤として、ポリエチレングリコール；デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、シュークロース、ラフィノース

- などの糖類や塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの無機塩類を用いることができ、好ましくはマンニトールあるいは塩化ナトリウム、特に好ましくはマンニトールを用いる。マンニトール等の糖類の添加量は製剤中に0.1～10重量%、さらに好ましくは0.5～6重量%である。塩化ナトリウム等の無機塩類の添加量は
- 5 製剤中に20～200mM、好ましくは50～150mMである。

- 本発明の製剤には界面活性剤をさらに含むことができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート
- 10 等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリンモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリンモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、
- 15 ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコ
- 20 ールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシシプロピレンアルキルエーテル；
- 25 ポリオキシエチエレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリ

オキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のH
LB 6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、
ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18の
アルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウ
ム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数
が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスル
ホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアル
キルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセ
ロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18
の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。本発
明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加す
ることができる。

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、
特に好ましいのはポリソルベート20、21、40、60、65、80、81、
85であり、最も好ましいのはポリソルベート20及び80である。

本発明のG-C S F含有製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般にはG-C
S F 1重量部に対して0.0001～10重量部であり、好ましくはG-C S
F 1重量部に対して0.01～5重量部であり、最も好ましくはG-C S F 1重
量部に対して0.2～2重量部である。具体的に、界面活性剤の添加量は、0.
0001～0.5重量%の間で適宜選択することができる。

本発明のG-C S F溶液製剤のpHは好ましくは5～7であり、さらに好まし
くはpHが5.5～6.8であり、さらに好ましくはpHが6～6.7であり、
最も好ましくはpHが6.5である。

本発明のG-C S F溶液製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦
形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有しても
よい。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホ
モシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグ
リセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリ
ウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒド

- リル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸バルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、
- 5 亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの
- 10 有機塩などの通常添加される成分を含んでよい。

本発明の溶液製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム－リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって製造できる。

- 15 本発明の安定化されたG-CSF溶液製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

- 本発明のG-CSF溶液製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス容器中に収納されている。容器はアンプル、バイアルまたはディスポーザブル
- 20 ル注射器のような規定用量の形状で供給することができ、あるいは注射用バックまたは瓶のような大用量の形状で供給することもできる。

- 本発明の製剤中に含まれるG-CSFの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には最終投与濃度で1～1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは10～800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは50
- 25 ～500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

本発明の製剤は、感染症や癌の化学治療において、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤などの薬剤を投与する際に同時投与すると、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力に基づいた防御機能を改善することが判明しており、臨床極めて有用である。従って、本発明の製剤はこれらの薬剤と併用投与することができる。

本発明のG-C S F 溶液製剤は後述の実施例に示すように、40℃-2週間の加速試験を行った後にも、極めて良好なG-C S F 残存率を示す。また、40℃-2週間の加速試験後にも、G-C S F のメチオニン残基酸化体生成率がほとんど観察されなかった。

- 5 本発明のG-C S F 溶液製剤は、40℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F 残存率が90%以上、好ましくは93%以上であり、最も好ましくは95%以上であり、あるいは25℃-6ヶ月間の安定性試験後におけるG-C S F 残存率が97%以上であり、あるいは10℃-1年間の安定性試験後におけるG-C S F 残存率が97%以上であり、かつ40℃-2週間の加速試験後G-C S F の
- 10 メチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下であり、従来知られているG-C S F 製剤に比べて極めて安定な製剤である。

- 本発明の検討の中で、溶液製剤を封入するバイアル、シリンジなどの容器条件（製造ロット間の差など）によっては、ヒスチジンを添加したときにメチオニン残基酸化体が増加する現象が観察され、この現象は特にシリンジ容器で顕著であ
- 15 った。このメチオニン残基酸化体の生成はメチオニンの添加によりほぼ完全に抑制された。従って、プレフィルドシリンジ製剤として供給する場合には、ヒスチジンなどのアミノ酸と、メチオニン又は既知の酸化防止剤などメチオニン残基酸化体の生成を抑制する薬剤を添加することにより、G-C S F の残存率が極めて高く、またG-C S F のメチオニン残基酸化体生成率の低い、長期安定化製剤と
- 20 することができる。

産業上の利用可能性

- 本発明のG-C S F 溶液製剤は、短期加速試験後においても、長期保存後においても、等張化剤の種類や容器形態によらず、G-C S F の残存率が極めて高く、
- 25 またG-C S F のメチオニン残基酸化体生成率をほぼ完全に抑制することのできる安定な製剤である。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

実施例 1: 各種アミノ酸の安定性に及ぼす効果

- 第 1 表記載の処方となるよう所定量のアミノ酸、0.01 重量% ポリソルベート 20 を含む 250 μ g/mL G-CSF、pH6.5 調剤液を無菌濾過した後、ガラスバイアルに上記調剤液を 1mL ずつ無菌的に充填し、打栓を施した。

第 1 表

| 被験試料 No. | G-CSF (μ g/mL) | 添加アミノ酸 (%) | ポリソルベート-20 (%) | pH |
|-------------|------------------------|---------------|-------------------|-----|
| 1 | 250 | グリシン | 0.01 | 6.5 |
| 2 | 250 | アラニン | 0.01 | 6.5 |
| 3 | 250 | プロリン | 0.01 | 6.5 |
| 4 | 250 | ロイシン | 0.01 | 6.5 |
| 5 | 250 | グルタミン酸ナトリウム | 0.01 | 6.5 |
| 6 | 250 | ヒドロキシプロリン | 0.01 | 6.5 |
| 7 | 250 | アルギニン塩酸塩 | 0.01 | 6.5 |
| 8 | 250 | リシン塩酸塩 | 0.01 | 6.5 |
| 9 | 250 | ヒスチジン塩酸塩 | 0.01 | 6.5 |

- このように、無菌的に調製・濾過を行い製造した第 1 表記載の G-CSF 製剤は、40℃の恒温槽において 2 週間の加速に供された。未加速品試料、および、40℃-2 週間加速品試料について、下記評価法 1 を用いて、40℃-2 週間加速後の残存率 (%) を算出した。

評価法 1

- C4 逆相カラム (4.6mm x 250mm、300 オングストローム) を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法により G-CSF 含量を測定した。G-CSF として、5 μ g 相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントにより G-CSF を溶出させ、215nm の波長で分光学的に検出し、G-CSF 含量を測定した。

- 本方法で測定した G-CSF 含量を用い、下記の式に基づき 40℃-2 週間加速後の残存率 (%) を算出した。

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{(加速品試料の G-CSF 含量)}}{\text{(未加速品試料の G-CSF 含量)}} \times 100$$

- 5 その結果を第2表に示す。

第2表

| 被験試料 No. | アミノ酸 | 40℃-2週間加速後の残存率 (%) |
|-------------|-------------|-----------------------|
| 1 | グリシン | 92.3 |
| 2 | アラニン | 89.6 |
| 3 | プロリン | 87.1 |
| 4 | ロイシン | 83.7 |
| 5 | グルタミン酸ナトリウム | 90.2 |
| 6 | ヒドロキシプロリン | 89.1 |
| 7 | アルギニン塩酸塩 | 96.3 |
| 8 | リシン塩酸塩 | 85.5 |
| 9 | ヒスチジン塩酸塩 | 97.0 |

- 10 このように、グリシン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン塩酸塩、及びヒスチジン塩酸塩の添加により 40℃-2 週間加速において良好な残存率が観察され、特にアルギニン塩酸塩及びヒスチジン塩酸塩の添加により残存率が顕著に向上することが見いだされた。

実施例2：メチオニン添加の G-CSF 酸化体生成に及ぼす効果

- 15 第3表記載の処方となるよう所定量のメチオニン、0.01重量% ポリソルベート 20 を含む 100 μg / ml G-CSF、pH6.5 調剤液を無菌濾過した後、ガラスバイアルに上記調剤液を 1mL ずつ無菌的に充填し、打栓を施した。

第3表

| 被験試料 No. | G-CSF (μg/mL) | Met (%) | ポリソルベート-20 (%) | pH |
|-------------|------------------|------------|-------------------|-----|
| 10 | 100 | 0 | 0.01 | 6.5 |
| 11 | 100 | 0.1 | 0.01 | 6.5 |

Met：メチオニン

このように、無菌的に調製・濾過を行い製造した第3表記載の G-CSF 製剤を、25℃の恒温槽において5日間保存後、下記評価法2を用いて G-CSF 酸化体含量を算出した。

5 評価法2

- C4 逆相カラム (4.6mm x 250mm, 300 オングストローム) を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法により G-CSF 含量を測定した。G-CSF として、5 μ g 相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントにより G-CSF を溶出させ、215nm の波長で分光学的に検出し、G-CSF 酸化体のピーク面積、G-CSF 未変化体のピーク面積を測定した。

本方法で測定した各ピーク面積値を用い、下記の式に基づき G-CSF 酸化体含量 (%) を算出した。

(G-CSF 酸化体ピーク面積)

$$15 \quad \text{G-CSF 酸化体含量 (\%)} = 100 \times \frac{\text{(G-CSF 酸化体ピーク面積)}}{\text{(G-CSF 酸化体ピーク面積)} + \text{(G-CSF 未変化体ピーク面積)}}$$

その結果を第4表に示す。

第4表

| 被験試料 No. | G-CSF (μ g/mL) | Met (%) | G-CSF酸化体含量 (%) |
|-------------|------------------------|------------|-------------------|
| 10 | 100 | 0 | 2.7 |
| 11 | 100 | 0.1 | N. D. |

- 20 Met : メチオニン
N. D. : 検出しない

メチオニンの添加により、G-CSF 酸化体の生成を抑制しうることを見いだした。

25 実施例3 : ヒスチジン添加量の安定性に及ぼす効果

第5表記載の処方となるよう所定量の塩酸ヒスチジン、0.1 重量% メチオニン

ン、0.01重量% ポリソルベート 20 を含む $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ G-CSF、pH6.5 調剤液を無菌濾過した後、ガラスバイアルに上記調剤液を 1mL ずつ無菌的に充填し、打栓を施した。

第5表

| 被験試料 No. | G-CSF ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | His (%) | Met (%) | NaCl (mM) | ポリソルベート-20 (%) | pH |
|-------------|--------------------------------------|------------|------------|--------------|-------------------|-----|
| 12 | 250 | 0 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 |
| 13 | 250 | 0.1 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 |
| 14 | 250 | 0.4 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 |
| 15 | 250 | 0.8 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 |
| 16 | 250 | 1.6 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 |

5 His：ヒスチジン塩酸塩として。

Met：メチオニン

NaCl：塩化ナトリウム

このように、無菌的に調製・濾過を行い製造した第5表記載の G-CSF 製剤は、
10 40℃の恒温槽において 2 週間の加速に供された。未加速品試料、および、40℃-2 週間加速品試料について、前述の評価法 1 を用いて、40℃-2 週間加速後の残存率 (%) を算出した。

その結果を第6表に示す。

第6表

| 被験試料 No. | His (%) | 40℃-2週間加速後の残存率 (%) |
|-------------|------------|-----------------------|
| 12 | 0 | 85.5 |
| 13 | 0.1 | 97.2 |
| 14 | 0.4 | 99.1 |
| 15 | 0.8 | 97.6 |
| 16 | 1.6 | 98.1 |

15 His：ヒスチジン塩酸塩として。

このように、ヒスチジンの添加に伴い、飛躍的に残存率が向上し、短期加速試験における安定性向上が可能となった。

また、被験試料 No. 12～16 はいずれも G-CSF のメチオニン残基酸化

体は検出限界以下であった。

実施例 4 : 容器形態が安定性に及ぼす効果

- 第 7 表記載の処方となるよう 0.4 重量%塩酸ヒスチジン、0.1 重量% メチオニン、0.01 重量% ポリソルベート 20 を含む $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ G-CSF、pH6.5 調剤液を無菌濾過した後、下記に示した容器形態に上記調剤液を 1mL ずつ無菌的に充填し、打栓を施した。

第 7 表

| 被験試料 No. | G-CSF ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | His (%) | Met (%) | NaCl (mM) | ポリソルベート-20 (%) | pH | 容器形態 |
|-------------|--------------------------------------|------------|------------|--------------|-------------------|-----|------|
| 17 | 250 | 0 | 0 | 100 | 0.01 | 6.5 | バイアル |
| 18 | 250 | 0 | 0 | 100 | 0.01 | 6.5 | シリンジ |
| 19 | 250 | 0.4 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 | バイアル |
| 20 | 250 | 0.4 | 0.1 | 100 | 0.01 | 6.5 | シリンジ |

His : ヒスチジン塩酸塩として。

- 10 Met : メチオニン

NaCl : 塩化ナトリウム

シリンジ : Becton Dickinson 社製ガラスシリンジ (ハイバック SCF 1mL ロング) に上記調剤液を充填し、Becton Dickinson 社製プランジャーストッパー (ハイバック SCF) で密封打栓したもの。

- 15 バイアル : 未処理白色ガラスバイアルに上記調剤液を充填し、ゴム栓で打栓したもの。

- 20 このように、無菌的に調製・濾過を行い製造した第 7 表記載の G-CSF 製剤は、40℃の恒温槽において 2 週間の加速に供された。未加速品試料、および、40℃-2 週間加速品試料について、前述評価法 1 を用いて、40℃-2 週間加速後、25℃-6 ヶ月保存後、10℃-1 年保存後の残存率 (%) を算出した。

その結果、第 8 表に示す。

第 8 表

| 被験試料 No. | His (%) | 容器形態 | 残存率 (%) | | |
|-------------|------------|------|----------------|----------------|---------------|
| | | | 40℃-2週間 加速後 | 25℃-6ヶ月 保存後 | 10℃-1年保 存後 |
| 17 | 0 | バイアル | 92.3 | 95.4 | 96.3 |
| 18 | 0 | シリンジ | 90.8 | 93.1 | 93.3 |
| 19 | 0.4 | バイアル | 98.0 | 97.7 | 98.1 |
| 20 | 0.4 | シリンジ | 99.1 | 97.9 | 98.1 |

- 40℃における短期加速試験だけでなく、25℃および 10℃における長期保存試験においても、ヒスチジンの添加効果は顕著であり、ヒスチジンの添加により
- 5 G-CSF 製剤の長期保存安定性確保が可能であることが見いだされた。また、被験試料 No. 19 及び 20 はいずれも G-CSF のメチオニン残基酸化体は検出限界以下であった。これらの結果から、容器形態によらず、安定化された G-CSF 製剤の提供が可能であると考えられた。

- なお、本検討の中で、溶液製剤を封入するバイアルやシリンジの製造ロット間の差により、ヒスチジン 0.4 % のみを添加したときにメチオニン残基酸化体が増加する現象が観察され、この現象は特にシリンジ容器で顕著であった。このメチオニン残基酸化体の生成はメチオニン 0.1 % の添加により検出限界以下とな
- 10 った。

15 実施例 5：等張化剤の安定性に及ぼす効果

第 9 表記載の処方となるよう、所定の等張化剤（塩化ナトリウムまたは D-マンニトール）、0.4 重量% 塩酸ヒスチジン、0.1 重量% メチオニン、0.01 重量% ポリソルベート 20 を含む 250 μ g/ml G-CSF、pH6.5 調剤液を無菌濾過した後、ガラスバイアルに上記調剤液を 1mL ずつ無菌的に充填し、打栓を施した。

20 第 9 表

| 被験試料 No. | G-CSF (μ g/mL) | His (%) | Met (%) | 等張化剤 | ポリソルベート-20 (%) | pH |
|-------------|------------------------|------------|------------|-------------|-------------------|-----|
| 21 | 250 | 0.4 | 0.1 | 100mM NaCl | 0.01 | 6.5 |
| 22 | 250 | 0.4 | 0.1 | 2.5% マンニトール | 0.01 | 6.5 |

His：ヒスチジン塩酸塩として。

Met : メチオニン

NaCl : 塩化ナトリウム

- 5 このように、無菌的に調製・濾過を行い製造した第 9 表記載の G-CSF 製剤は、
40℃の恒温槽において 2 週間の加速に供された。未加速品試料、および、40℃-
2 週間加速品試料について、前述評価法 1 を用いて、25℃-4 ヶ月、25℃-6 ヶ月
及び 10℃-1 年保存後の残存率 (%) を算出した。

その結果を第 10 表に示す。

第 10 表

| 被験試料 No. | 等張化剤 | 残存率 (%) | | |
|-------------|--------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | 25℃-4 ヶ月 保存後 | 25℃-6 ヶ月 保存後 | 10℃-1 年 保存後 |
| 21 | NaCl | 97.7 | 96.4 | 97.6 |
| 22 | マンニトール | 97.4 | 97.1 | 96.7 |

10

また、被験試料 No. 21 及び 22 はいずれも G-CSF のメチオニン残基酸化体は検出限界以下であった。

以上の結果から等張化剤の種類によらず、良好な安定性確保が可能であることが判明した。

請求の範囲

1. 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まず、また安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を含むG-C S F溶液製剤。
- 5 2. アミノ酸がグリシン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上である、請求項1記載のG-C S F溶液製剤。
3. アミノ酸がアルギニン及びヒスチジン又はそれらの塩から選択される一種以上である、請求項2記載のG-C S F溶液製剤。
- 10 4. アミノ酸がヒスチジン又はその塩である請求項3記載のG-C S F溶液製剤。
5. メチオニンをさらに含む請求項1～4のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。
6. アミノ酸の添加量が0.01重量%～10重量%である請求項1～5のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。
- 15 7. ヒスチジン又はその塩の添加量が0.01重量%～10重量%である請求項6に記載のG-C S F溶液製剤。
8. マンニトール及び／又は塩化ナトリウムをさらに含む請求項1～7のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。
9. 界面活性剤をさらに含む請求項1～8のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。
- 20 10. 界面活性剤がポリオキシエチレンソルピタンアルキルエステルである請求項9記載のG-C S F溶液製剤。
11. 界面活性剤がポリソルベート20及び／又は80である請求項10記載のG-C S F溶液製剤。
- 25 12. pHが5～7である請求項1～11のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。
13. pHが5.5～6.8である請求項12記載のG-C S F溶液製剤。
14. G-C S FがCHO細胞から産生されたG-C S Fである請求項1～13のいずれかに記載のG-C S F溶液製剤。

15. パイアル製剤又はプレフィルドシリンジ製剤である請求項1～14のいずれかに記載のG-C S F製剤。
16. プレフィルドシリンジ製剤である請求項15記載のG-C S F製剤。
17. 40℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であり、あるいは25℃-6ヶ月間の安定性試験後におけるG-C S F残存率が97%以上であり、あるいは10℃-1年間の安定性試験後におけるG-C S F残存率が97%以上であり、かつ40℃-2週間の加速試験後G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C S F溶液製剤。
18. 実質的にG-C S Fのメチオニン残基酸化体を含まない、安定なG-C S F溶液製剤。
19. 安定化剤として、実質的にタンパク質を添加せず、また安定化剤として、少なくとも一種のアミノ酸又はその塩を添加することを含むG-C S F溶液製剤の安定化方法。
20. 少なくとも一種のアミノ酸又はその塩の、安定化されたG-C S F溶液製剤の製造のための使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K38/22, 9/08, 47/18, 47/26, 47/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/22, 9/08, 47/18, 47/26, 47/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------------|
| X | JP 63-146829 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 June, 1988 (18.06.88), Full text; especially, Claims (Family: none) | 1-4, 6, 7, 12-20 5, 8-11 |
| X | US 5919757 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 06 July, 1999 (06.07.99), Claims; Column 6, lines 15 to 24, working example 10 & JP 08-505610 A & DE 4242919 A & WO 94/14466 A1 & AU 9458109 A & EP 674525 A & NZ 259333 A & KR 266146 B | 1-3, 6, 12-20 5, 8-11 |
| Y | WO 92/15614 A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.), 17 September, 1992 (17.09.92), Full text; especially, Claims & AU 9215564 A & US 5272135 A | 5 |
| Y | US 5358708 A (SCHERING CORPORATION), 25 October, 1994 (25.10.94), Claims (Family: none) | 5 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November, 2001 (15.11.01)Date of mailing of the international search report
04 December, 2001 (04.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07600

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | GB 2193631 A (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 17 February, 1988 (17.02.88), Claims; page 3, lines 33-42 & JP 63-146826 A & JP 63-146827 A & DE 3723781 A & FR 2601591 A & ZA 8705268 A & DK 8703683 A & AU 8775665 A & IL 83220 A | 8-11 |
| PX | WO 00/51629 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 September, 2000 (08.09.00), Full text; especially, Claims & JP 2000-247903 A & AU 200026954 A | 1-20 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, 9/08, 47/18, 47/26, 47/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, 9/08, 47/18, 47/26, 47/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | JP 63-146829 A (中外製薬株式会社) 18.6月.1988(18.06.88) | 1-4, 6, 7, |
| Y | 全文、特に特許請求の範囲 (ファミリーなし) | 12-20 5, 8-11 |
| X | US 5919757 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6.7月.1999(06.07.99) | 1-3, 6, 12-20 |
| Y | 特許請求の範囲、第6欄第15~24行及び実施例10 &JP 08-505610 A &DE 4242919 A &WO 94/14466 A1 &AU 9458109 A &EP 674525 A1 &NZ 259333 A &KR 266146 B | 5, 8-11 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日以前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 11. 01

国際調査報告の送付日

04.12.01

国際調査機関の名称及びて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

板本 佳子

印

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | WO 92/15614 A1 (CHIRON OPHTHALMICS, INC.) 17. 9月. 1992 (17. 09. 92) 全文、特に特許請求の範囲 &AU 9215564 A &US 5272135 A | 5 |
| Y | US 5358708 A (SCHERING CORPORATION) 25. 10月. 1994 (25. 10. 94) 特許請求の範囲 (ファミリーなし) | 5 |
| Y | GB 2193631 A (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 17. 2月. 1988 (17. 02. 88) 特許請求の範囲及び第3頁第33~42行 &JP 63-146826 A &JP 63-146827 A &DE 3723781 A &FR 2601591 A &ZA 8705268 A &DK 8703683 A &AU 8775665 A &IL 83220 A | 8-11 |
| PX | WO 00/51629 A1 (中外製薬株式会社) 8. 9月. 2000 (08. 09. 00) 全文、特に特許請求の範囲 &JP 2000-247903 A &AU 200026954 A | 1-20 |